

- moderate and high rheumatoid arthritis disease activity: results from a large Japanese post-marketing surveillance study. 9th annual meeting for European League Against Rheumatism, 2008.
2. T. Koike, M. Harigai, S. Inokuma, K. Inoue, N. Ishiguro, J. Ryu, T. Takeuchi, Y. Tanaka, H. Yamanaka, B. Freundlich, K. Fujii, M. Suzukawa. Safty and effectiveness of switching from infliximab to etanercept in patients with rheumatoid arthritis: results from a large Japanese post marketing surveillance9th annual meeting for European League Against Rheumatism, 2008.

#### 竹内勤

1. Boulos Haraoui, Josef S Smolen, Daniel Aletaha, Ferdinand C Breedveld, Maarten de Wit, Maxime Dougados, Paul Emery, Allan Gibofsky, Desiree M Van Der Heijde, Gerd R Burmester, Mario Cardiel-Rios, Catalin Codreanu, Patrick Durez, Joao Eurico Fonseca, Winfried B Graninger, Verdat Hamuryudan, Maria Jose Jannaut-Pena, Jochen Kalden, Tore K Kvien, Ieda Laurindo, Carlomaurizio Montecucco, Jose A Pereira Da Silva, Guyla Poor, Pedro Ivan Santos Moreno, Ewa Stanislawski-Biernat, Tsutomu Takeuchi, and the Treat to Target Taskforce. Treating Rheumatoid Arthritis to Target: Multinational Recommendations Assessment Questionnaire. 75th Annual Scientific meeting of ACR, October 2010, Atlanta, USA.
2. Kameda H, Kanbe K, Sato E, Ueki Y, Saito K, Nagaika S, Hidaka T, Atsumi T, Tsukano M, Kasama T, Shiozawa S, Tanaka Y, Yamanaka H, Takeuchi T. Etanercept (ETN) plus methotrexate (MTX) combination therapy resulted in a better outcome in joint damage and physical function than ETN monotherapy even in patients with active rheumatoid

arthritis despite MTX treatment: 52-week results from the JESMR study. Annual European Congress of Rheumatology. 2009年6月、コペンハーゲン.

3. T Takeuchi : Industry Sponsored Symposium 3. HUMIRA: for a long term and comprehensive RA Disease management-clinical Data, Radiographic Data, Functionally Data, Work Productivity Data-The 9th World Congress on Inflammation. 2009年7月、東京.
4. Nishimura K, Kameda H, Kurasawa T, Kondo T, Okuyama A, Nishi E, Takei H, Suzuki K, Nagasawa H, Abe H, Tsuzaka K, Amano K, Takeuchi T. Influence of tocilizumab to interstitial pneumonia (IP) complicating rheumatoid arthritis patients. The 9th World Congress on Inflammation. 2009年7月、東京.
5. T Takeuchi: New biologics for rheumatoid arthritis in Japan: A multi-center, randomized, double-blind, controlled, dose-response study of Abatacept(BMS-188667) in Japanese active rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to Methotrexate. The 53<sup>rd</sup> Annual General Assembly and Scientific meeting of Japan College of Rheumatology, The 18<sup>th</sup> International Rheumatology symposium. Tokyo. April.2009.
6. T Takeuchi: Evidences of infliximab treatment for A in JAPAN-RECONFIRM and RISING study- The 4th Asian congress on Autoimmunity. 12th September,2009 Singapore
7. T Takeuchi. Japanese PMS for Etanercept. 8th Asia Pacific League Against Rheumatism, 2008.

#### 宮坂信之

1. 上阪等, 村上洋介, 宮坂信之. 新規分子治療標的薬 サイクリン依存性キナーゼ阻害薬 Inflammation and Regeneration 2010.07.
2. 上阪等, 村上洋介, 野々村美紀, 宮坂信之. 疾患

- の病態と分子医学 関節リウマチ治療の新たな標的分子 日本臨床分子医学会学術総会 2008.07
3. 上阪等, 村上洋介, 野々村美紀, 宮坂信之. 疾患の病態と分子医学 関節リウマチ治療の新たな標的分子 日本臨床分子医学会学術総会 2008.07

### 三森経世

1. 村上孝作, 三森経世ほか: 早期関節リウマチにおける抗CCP抗体価と疾患活動性との相関. 第52回日本リウマチ学会, 札幌, 2008年4月
2. 伊藤能永, 三森経世ほか: II型コラーゲン誘発性関節炎(CIA)局所におけるIL-17分泌細胞の解析. 第52回日本リウマチ学会, 札幌, 2008年4月
3. Murakami K, Mimori T, et al: Correlation between anti-CCP antibody and disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. 72nd American College of Rheumatology, San Francisco, Oct 2009
4. Ito Y, Mimori T, et al: Gamma delta T cells are the predominant IL-17-producing cells in affected joints of collagen-induced arthritis. 第38回日本免疫学会, 京都, 2008年12月
5. Murakami K, Mimori T, et al: Follistatin-Related Protein (FRP/FSTL1) is one of the regulators of IL-6 production in fibroblast-derived cell lines. 第38回日本免疫学会, 京都, 2008年12月
6. Ohmura K, Mimori T, et al: HLA-DR8 is associated with ACPA-negative RA in Japanese (Oral presentation). 第14回国際免疫会議, 神戸, 2010年8月

### 山本一彦

1. Okamura Tomohisa, Fujio Keishi, Shibuya Mihokio, Sumitomo Shuji, Shoda Hirofumi, Sakaguchi Shimon, Yamamoto Kazuhiko Identification of a novel Egr-2 dependent IL-10 secreting CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cell. The 9<sup>th</sup> World Congress on

inflammation 2009.7.7

2. Sumitomo Shuji, Fujio Keishi, Okamura Tomohisa, Shoda Hirofumi, Yamamoto Kazuhiko. The similarity between human tonsil CD4+CD25-LAG3+ T cells and mouse CD4+CD25-LAG3+ T cells. The 39<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese Society for immunology.

### H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

### 【Ⅲ】 総合研究報告

## 関節リウマチの関節破壊ゼロを目指す治療指針の確立、及び根治・修復療法の開発に関する研究

研究分担者 小池隆夫(北海道大学大学院医学研究科 内科学講座・第二内科 教授)

研究協力者 深江 淳(北海道内科リウマチ科病院 医長)

### 研究要旨

関節リウマチ(RA)は関節滑膜に自己免疫性の炎症を起こす疾患である。炎症を起こした関節では異常な血流が関節腔内に生じる。この血流を評価することで炎症そのものを評価することが可能である。我々は、手指単関節の評価可能に、パワードプラ法を利用した定量関節超音波法を確立した。初めの検討では、多関節痛を主訴に初診となった患者を対象に、関節MRI、関節超音波検査を施行した結果、超音波検査は、MRI法と同等の関節炎検出率が認められた。また関節血流値のレベルにより異常・正常の分類できる可能性が示された。これにより関節超音波検査によりRAを診断できる可能性が明らかとなった。

次に我々が行った検討は、活動期のRA患者を対象に、DMARDs治療開始前と8週間後のMCP関節の関節血流値を測定した。また治療前から20週間後の関節破壊進行度を単純X線写真で評価した。この結果、手指単関節において、治療前の関節血流値が高値であるほど骨破壊が進行することが明らかとなった。更にDMARDs治療開始8週間で血流が改善するほど骨破壊が抑制されることが明らかとなった。また20週間後に関節破壊進行群と非進行群を分類するための血流変化率の理想的カットオフ値は72.2%改善であった。この結果により、関節超音波検査によりRAの炎症を評価し、治療効果判定の可能性が明らかとなった。

### A.研究目的

生物学的製剤の登場により関節リウマチ(RA)の治療面は格段に進歩した。治療面のエビデンスが構築されるにつれて、RAをより早期診断し、適切な指標を用いることで生物学的製剤を含めた治療内容をステップアップすることでRAの予後を改善し、ひいては完全寛解にいたらせる可能性があることがいわれてきた。しかしながら現時点では、RAの早期診断法と、治療指標としては確立されたものが存在せず、治療面と比較して診断評価の分野の遅れが指摘されてきた。各方面で多種の研究が進行している。そのなかで、近年、画像診断の利用に注目が集まってきた。関節超音波法はリアルタイムに関節内の詳細な

情報を得ることが可能であり、欧米を中心にRA診療ツールとして有用性がいわれている。

我々は、手指関節を対象として、パワードプラ法を利用した関節腔内に生じた炎症性異常血流を数値評価可能な定量関節超音波法を作成した。関節血流は炎症そのものを反映するとされているが、これまでは詳細な評価法が存在しなかった。我々は、これを用いて、関節炎の診断と、また関節血流値と骨破壊の関係を検討した。

### B.研究方法

画像検査:関節超音波検査は同法に熟練した3名の検査技師が施行した。使用機器は13MHzリニア型探触子

(HITACHI EUP-L34P, HITACHI)、超音波断層装置 (HITACHI EUB-6500, HITACHI) を使用した。本体に装備する Vascularity mode を使い、寸法を固定した方形 ROI 内の血流ピクセルを測定し、関節血流値とした。

統計解析:統計解析には、EXCEL プログラム(Microsoft)、MedCalc プログラム (MedCalc Software)を使用した。

#### 検討1:

平成20年3月から平成20年11月までに多関節痛を主訴とする初診患者21例を対象とした。初診時、手指造影MRI検査、関節超音波検査を施行し、各々は診療情報を秘匿とした検査技師、放射線読影専門医師が読影を行った。外来リウマチ専門医がアメリカリウマチ学会1987改訂基準によりRA確定診断を行った。確定診断後、DMARDs治療を開始し、8週間後に再評価を行った。本研究プロトコルは病院倫理委員会で承認され、全症例が同意を取得後、本研究に参加している。

1. 初診時のMRI検査、超音波検査の各々で、画像所見とRA診断の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率を検討した。

2. 手指個々の関節炎の有無を鑑別する関節血流値のカットオフ値を、receiver operating characteristic (ROC) 解析を行い算出した。

#### 検討2:

ACR1987分類基準にて確定診断され、DAS28-ESR (>2.7) で活動期と診断された関節リウマチ患者19症例を対象とした。本研究プロトコルは病院倫理委員会で承認され、全症例が同意を取得後、本研究に参加している。DMARDs治療開始前、8週後の各々に手指関節(MCP)に対して関節超音波法を施行し、関節血流値を測定した。更に治療開始前、20週後に両手の単純X線写真を施行し、Genant-modified Sharp scoreにより骨破壊進行度を評価した。各々は診療情報を秘匿とした検査技師、リウマチ専門医師が検査、読影を行った。

1. 手指個々の治療前-8週間のそれぞれの血流値変化率を計算した ((治療前血流値 - 8週間後血流値) / 治療

前血流値 × 100 (%))。

2. 手指個々の治療前-20週間の Genant modified Sharp Score の進行度を計算した。

3. 手指関節において、血流値変化率と骨破壊進行度の関係を検討した (receiver operating characteristic (ROC) 解析)。

(倫理面への配慮)

患者には、検査、治療内容、研究成果の学会発表についてインフォームドコンセントを得ている。また本邦における保険診療に従った検査、治療を行っている。

### C.研究結果

#### 結果1.

1. 関節リウマチ 11 例 (平均年齢 59.7, 女:男=11:0)、非 RA 11 例 (平均年齢 52.1, 女:男=10:0) と診断された。初診画像所見が陽性であり、最終的に RA と診断された群に対する MRI 検査の診断率は、感度 100%, 特異度 63.6%, 陽性的中率 73.3%, 陰性的中率 100% に対して、超音波検査は感度 90.9%, 特異度 45.5%, 陽性的中率 62.5%, 陰性的中率 83.3% であった。

2. 個々関節に注目し、RA 症例で MRI 検査、超音波検査ともに陽性関節を関節炎陽性として、非 RA の関節を関節炎陰性とした関節炎血流値の理論的カットオフ値は、ROC 解析した結果、10% であった (感度 94.3%、特異度 94.7%、ROC-AUC 0.98 ± 0.0166 vs 0.5 P<0.0001)。

3. RA 6 症例で、8 週間後、DAS28 は有意に低下した (5.26 ± 1.19 → 3.6 ± 0.4 P=0.0076, good response 0%, moderate response 100%, no response 0%)。手指 20 関節血流合計値は低下する傾向が認められたが、有意差は認められなかった。DAS28 改善が認められた症例の中で、血流が残存した関節には関節破壊が進行した症例を経験した。

#### 結果2.

関節リウマチ 19 例(平均年齢 54, 女:男=17:2)の治療経過

は以下の通りである。13 症例は DMARDs 単剤 (MTX 9 例、SSZ 2 例、BUC 2 例) 治療を受けた。6 症例は DMARDs 併用 (MTX+BUC 2 例、MTX+SSZ 1 例、SSZ+FK506 1 例) 治療を受けた。また 13 症例は、経口プレドニゾロン (3-10mg/day) 投与を受けた。治療開始前 DAS28-ESR ( $5.21 \pm 1.39$ ) は、8 週後 ( $4.08 \pm 1.60$ ) と、有意差をもって低下した ( $P=0.0001$ )。8 週後と 20 週後の間には有意差を認めなかった。治療開始前、手指関節の骨破壊を、Genant-modified Sharp score で評価した結果、MCP 関節の中央値は 0.5 (IQR 0-1.5) であった。20 週間後の中央値は、0.75 (IQR 0-1.5) であった。MCP 関節の検討では有意差をもって血流値変化率と骨破壊進行度は負の相関を示した (Spearman's  $\rho = -0.340$ ,  $P=0.00386$ )。血流陽性関節に注目し、20 週後に骨破壊進行を抑制できた関節とそうでない関節を分類する 0-8 週間の関節血流変化率のカットオフ値は 72.2% 改善であった (ROC-AUC  $0.697 \pm 0.07$  vs 0.5,  $P=0.0053$ , 特異度 82.86%, 感度 61.54%)。

#### D. 考察

関節リウマチ診療で画像検査が診断面、評価面で注目されている。MRI 検査は一度に施行可能な関節部位が限定され、検査コストが高価である等の理由から、繰り返しの検査には不適である。MRI 検査は、その画像の特異性などから RA の早期診断に有用と考えられる。一方で超音波検査は、その低侵襲性や、比較的 low コスト、リアルタイムに関節を観察できる利便性から炎症評価に有用であると考えられた。本研究は、超音波検査は異常血流を評価することにより、関節炎の早期診断、また個々関節炎の定量評価が可能であることを報告した。

RA の診断においては滑膜炎の有無を判断することに重要性が示されている。本研究では手指関節炎の有無を MRI 法とほぼ同等の診断能を示した。MRI 検査、超音波検査は両者ともに有用であり、将来的に診断基準に組み込まれる方向性も考えられた。

また炎症評価として関節異常血流を数値評価できる関節超音波法は有用である。本研究結果から、手指関節にお

いては治療前の関節異常血流値が高値であるほど骨破壊が進行することが明らかになった。このことから個々の関節血流値は炎症のレベルを直接反映しており、定量関節超音波法はこれを評価することに適切な方法であると考えられた。また治療前に関節血流値が高値であることは予後不良であると考えられた。

今回の症例に対して、DMARDs 治療を開始したところ、関節血流値は治療により変化した。治療前から 8 週間の変化率を算出し、骨破壊進行度の関係を検討したところ、血流が改善するほど、骨破壊進行が抑制されることが明らかになった。この結果から、関節血流の変化率は薬剤の治療反応を評価する指標となり得ると考えられた。

RA 診療の骨子は、RA を早期診断し、適切な指標により、治療をステップアップし、速やかに炎症を改善することでより良い長期予後を得ることが可能であると考えられてきている。先の我々の報告では、手指関節の異常関節血流の総和により、RA をスクリーニングすることが可能であることを報告した。今回の研究結果も併せた上で、関節血流値により、RA の早期診断を行い、確定後は速やかに、この評価を治療前値として、治療反応を追っていくアルゴリズムを確立することが可能と考えられた。今回の研究は治療反応として関節血流をどのように動かすかを検討した。すなわち、治療前後の二点間の血流値変化率と、骨破壊進行度が相関することを前回報告したが、この結果は、血流値変化率により、治療効果を評価できる可能性を示唆する。また、治療開始後、一定の期間内に一定の改善率(変化率)に達成することが出来なければ、結果として骨破壊が進行する可能性がある。今回の結果は、この改善率として手指単関節においては 70% 改善が達成されなければ 20 週間後には骨破壊が進行することを示唆している。血流値変化率は、臨床的反応より客観性があり、またより早期に治療効果を評価できる可能性がある。

現在の RA 治療プロトコールでは、ファーストライン治療は DMARDs である。これらは遅効性であるため、臨床的な問題として治療反応を患者、医師ともに実感、確認するには相当な時間が必要である。現在の臨床的指標では早期に

治療反応を予測することが不可能である。関節血流の変化は症状変化に先行して変化する可能性があり、治療評価を早い段階で判断できる可能性がある。具体的には、関節血流を指標とした RA 治療アルゴリズムとして、全般的評価(グローバル)、単関節に注目した局所評価(ローカル)とそれぞれの改善率の基準を設定し、RA をシステマティックに治療することが考えられる。これにより薬効評価の難しい DMARDs 治療、また現時点では適応が限定されている生物学的製剤の早期導入の指標となる可能性がある。

#### E. 結論

1. 関節異常血流を定量できる定量関節超音波法を確立した。
2. 手指関節において、同法と関節 MRI を比較検討し、同等の関節炎検出率を確認した。
3. 手指単関節炎の異常血流値のカットオフを算出した。
4. 手指関節において、治療前、関節血流は高値であるほど、骨破壊が進行した。
5. 手指関節において、DMARDs 治療により、関節血流は変化し、その変化率は骨破壊進行度と有意に逆相関した。
6. 手指関節において、骨破壊進行と非進行を分類する DMARDs 治療による関節血流変化率の理想的カットオフ値は 72.2%改善であった。

関節血流の有無により関節炎の診断が可能であることが示唆された。関節血流の程度により骨破壊進行の予後予測が可能であり、その変化率により治療反応を評価することが可能と考えられた。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Fukae J, Kon Y, Henmi M, Sakamoto F, Narita A, Shimizu M, Tanimura K, Matsuhashi M, Kamishima T, Atsumi T, Koike T. Change of synovial vascularity

in a single finger joint assessed by power Doppler sonography correlated with radiographic change in rheumatoid arthritis: Comparative study of a novel quantitative score with a semiquantitative score. *Arthritis Care Res.*62(5):657-663,2010

2. Yamada H, Atsumi T, Amengual O, Koike T, Furuta I, Ohta K, Kobashi G. Anti-beta2 glycoprotein-I antibody increases the risk of pregnancy-induced hypertension: a case-controlled study. *J Reprod Immunol.* 84(1):95-99,2010
3. Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Yoshida M, Aoki K, Kondo T, Miyoshi H, Wada N, Tajima T, Terauchi Y, Yoshioka N, Koike T. Problems in diagnosing atypical Gitelman's syndrome presenting with normomagnesaemia. *Clin Endocrinol (Oxf).*72(2):272-276,2010
4. Miyoshi H, Souza SC, Endo M, Sawada T, Perfield JW 2nd, Shimizu C, Stancheva Z, Nagai S, Strissel KJ, Yoshioka N, Obin MS, Koike T, Greenberg AS. erlipin overexpression in mice protects against diet-induced obesity. *J Lipid Res.*51(5):975-982,2010
5. Shimane K, Kochi Y, Horita T, Ikari K, Amano H, Hirakata M, Okamoto A, Yamada R, Myouzen K, Suzuki A, Kubo M, Atsumi T, Koike T, Takasaki Y, Momohara S, Yamanaka H, Nakamura Y, Yamamoto K. The association of a nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis Rheum.*62(2):574-579,2010
6. Kondo T, Yasumoto A, Arita K, Sugita J, Shigematsu A, Okada K, Takahata M, Onozawa M, Kahata K, Takeda Y, Obara M, Yamamoto S, Endo T, Nishio M, Sato N, Tanaka J, Hashino S, Koike T, Asaka M, Imamura M. Successful treatment of acute

- myelogenous leukemia with favorable cytogenetics by reduced-intensity stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 91(2):310–321,2010
7. Suzuki E, Amengual O, Atsumi T, Oku K, Hashimoto T, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Ieko M, Fukushima K, Koike T. Increased expression of phospholipid scramblase 1 in monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.*37(8):1639–1645,2010
  8. Ieko M, Yoshida M, Naito S, Nakabayashi T, Kanazawa K, Mizukami K, Mukai M, Atsumi T, Koike T. Increase in plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor may not contribute to thrombotic tendency in antiphospholipid syndrome because of inhibitory potential of antiphospholipid antibodies toward TAFI activation. *Int J Hematol.*91:776–783,2010
  9. Nanjo K, Nagai S, Shimizu C, Tajima T, Kondo T, Miyoshi H, Yoshioka N, Koike T. Identification and functional analysis of novel calcium-sensing receptor gene mutation in familial hypocalciurichypercalcemia. *Endocrine J.* 57(9):787–792,2010
  10. Takahata M, Hashino S, Okada K, Onozawa M, Kahata K, Sugita J, Shigematsu A, Kondo T, Yamamoto S, Endo T, Nishio M, Ito Y, Tanaka J, Koike T, Asaka M, Imamura M. Reduced intensity conditioning regimen with fludarabine, busulfan, and low-dose TBI(Flu-BU2-TBI): Clinical efficacy in high-risk patients. *Am J Hematol.*84:243–248,2010
  11. Kamishima T, Fujieda Y, Atsumi T, Mimura R, Koike T, Terae S, Shirato H. Contrast-Enhanced Whole Body Joint MR Imaging in Patients with Unclassified Arthritis Developing Early Rheumatoid Arthritis in 2 Years: Feasibility Study and Correlation with MR Imaging Findings of the Hands. *Am J Roentgenol.*195: 287–92,2010
  12. Kasahara I, Nishio M, Yamamoto S, Endo T, Fujimoto K, Yamaguchi K, Takeda Y, Goto H, Sato N, Koike T. Cord blood transplantation with a reduced-intensity conditioning regimen for patients with relapsed aggressive multiple myeloma after cytoreduction with bortezomib. *Int J Hematol.* 90(3):413–415,2009
  13. Nakagawa H, Yasuda S, Matsuura E, Kobayashi K, Ieko M, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. Nicked  $\beta$ 2-glycoprotein I binds angiostatin 4.5 (plasminogen kringle 1–5) and attenuates its antiangiogenic property. *Blood.*114(12):2553–2559,2009
  14. Horita T, Atsumi T, Yoshida N, Nakagawa H, Kataoka H, Yasuda S, Koike T. STAT4 single nucleotide polymorphism, rs7574865 G/T, as a risk for antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.*68(8):1366–1367,2009
  15. Kunieda T, Nakanishi N, Matsubara H, Ohe T, Okano Y, Kondo H, Nishimura M, Shirato K, Tanabe N, Homma S, Yoshida S, Inokuma S, Kodama M, Koike T, Hishida H. Effects of Long-Acting Beraprost Sodium (TRK-100STP) in Japanese Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Int Heart J.* 50(4):513–529,2009
  16. Yoshioka N, Kurihara Y, Manda N, Komori K, Kato M, Kijima H, Wada N, Yanagisawa K, Aoki S, Ono Y, Koike T. Step-up therapy with biphasic insulin aspart-70/30 Sapporo 1-2-3 study *Diabetes Res Clin Pract.* 85(1):47–52,2009
  17. Nishio M, Endo T, Fujimoto K, Yamamoto S, Obara M, Yamaguchi K, Takeda Y, Goto H, Kasahara I, Sato N, Koike T. FCGR3A-158V/F polymorphism may correlate with the levels of immunoglobulin in patients with non-Hodgkin's lymphoma after rituximab treatment as an adjuvant to autologous stem cell transplantation. *Eur J Haematol.* 82(2):143–147,2009



18. Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 68(6):1030–1035,2009
19. Yamada H, Atsumi T, Kobashi G, Ota C, Kato EH, Tsuruga N, Ohta K, Yasuda S, Koike T, Minakami H. Antiphospholipid antibodies increase the risk of pregnancy-induced hypertension and adverse pregnancy outcomes. *J Reprod Immunol.* 79:188–195,2009
20. Nakamura A, Terauchi Y, Ohyama S, Kubota J, Shimazaki H, Nambu T, Takamoto I, Kubota N, Eiki J, Yoshioka N, Kadowaki T, Koike T. Impact of small-molecule glucokinase activator on glucose metabolism and beta-cell mass. *Endocrinology.* 150(3):1147–1154,2009
21. Hashimoto S, Yamada K, Kawata T, Mochizuki T, Schnermann JB, Koike T. Abnormal Autoregulation and Tubuloglomerular Feedback in Prediabetic and Diabetic OLETF rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 296:598–604,2009
22. Fukae J, Shimizu M, Kon Y, Tanimura K, Matsuhashi M, Kamishima T, Koike T. Screening for rheumatoid arthritis with finger joint power Doppler ultrasonography: quantification of conventional power Doppler ultrasonographic scoring. *Mod Rheumatol.* 19:502–506,2009
23. Endo T, Fujimoto K, Nishio M, Yamamoto S, Obara M, Sato N, Koike T. Clearance of hepatitis C virus after changing the HAART regimen in a patient infected with hepatitis C virus and the human immunodeficiency virus. *J Med Virol.* 81(6):979–982,2009
24. Nishio M, Endo T, Fujimoto K, Yamamoto S, Obara M, Yamaguchi K, Takeda Y, Goto H, Kasahara I, Sato N, Koike T. FCGR3A-158V/F polymorphism may correlate with the levels of immunoglobulin in patients with non-Hodgkin's lymphoma after rituximab treatment as an adjuvant to autologous stem cell transplantation. *Eur J Haematol.* 82(2):143–7,2008
25. Oku K, Atsumi T, Amengual O, Koike T. Antiprothrombin antibody testing: detection and clinical utility. *Semin Thromb Hemost.* 34(4):335–339,2008
26. Fukaya S, Yasuda S, Hashimoto T, Oku K, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. Clinical features of haemophagocytic syndrome in patients with systemic autoimmune diseases: analysis of 30 cases. *Rheumatology.* 47(11):1686–1691,2008
27. Goto H, Nishio M, Kumano K, Fujimoto K, Yamaguchi K, Koike T. Discrepancy between disease activity and levels of vascular endothelial growth factor in a patient with POEMS syndrome successfully treated with autologous stem-cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 42(9):627–629,2008
28. Shiratori S, Yasumoto A, Tanaka J, Shigematsu A, Yamamoto S, Nishio M, Hashino S, Morita R, Takahata M, Onozawa M, Kahata K, Kondo T, Ota S, Wakasa K, Sugita J, Koike T, Asaka M, Kasai M, Imamura M. A retrospective analysis of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T cell leukemia/lymphoma (ATL): clinical impact of graft-versus-leukemia/lymphoma effect. *Biol Blood Marrow Transplant.* 14:817–823,2008
29. Bohgaki M, Tsukiyama T, Nakajima A, Maruyama S, Watanabe M, Koike T, Hatakeyama S. Involvement of Ymer in suppression of NF-kappaB activation by regulated interaction with lysine-63-linked polyubiquitin chain. *Biochim Biophys Acta.* 1783(5):826–837,2008
30. Atsumi T, Amengual O, Koike T. Etiopathology of the Antiphospholipid syndrome, In: Tanaka K, Davie

- EW, editor. Recent Advances in Thrombosis and Haemostasis 2008.521-535,2008
31. Shigematsu A, Kondo T, Yamamoto S, Sugita J, Onozawa M, Kahata K, Endo T, Shiratori S, Ota S, Obara M, Wakasa K, Takahata M, Takeda Y, Tanaka J, Hashino S, Nishio M, Koike T, Asaka M, Imamura M. Excellent outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using a conditioning regimen with medium-dose VP-16, cyclophosphamide and total-body irradiation for adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 14(5):568-575,2008
32. Atsumi T, Horita T, Minori T, Koike T. Exchange of information in Rheumatology between East and West : From Man'yo-shu to the Future. *Arthritis Rheum.* 58(2):140-142,2008
33. Kon Y, Atsumi T, Hagiwara H, Furusaki A, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Amengual O, Koike T. Thrombotic microangiopathy in patients with phosphatidylserine dependent antiprothrombin antibodies and antiphospholipid syndrome. *ClinExpRheumatol.* 26(1):129-132,2008
34. Okamoto T, Atsumi T, Shimizu C, Yoshioka N, Koike T. The potential role of macrophage migration inhibitory factor on the migration of vascular smooth muscle cells. *J AtherosclerThromb.* 15(1):13-19,2008
35. Bohgaki T, Atsumi T, Koike T. Autoimmune disease after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Autoimmun Rev.* 7(3):198-203,2008
36. Kataoka H, Atsumi T, Hashimoto T, Horita T, Yasuda S, Koike T. Polymyalgia rheumatica as the manifestation of unclassified aortitis. *Mod Rheumatol.* 18(1):105-108,2008
37. Nishio M, Endo T, Nakao S, Sato N, Koike T. Reversible cardiomyopathy due to secondary hemochromatosis with multitransfusions for severe aplastic anemia after successful non-myeloablative stem cell transplantation. *Int J Cardiol.* 127:400-401,2008
- H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

## 関節リウマチの関節破壊ゼロを目指す治療指針の確立、及び根治・修復療法の開発に関する研究

研究分担者 住田孝之 (筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学 教授)  
研究協力者 神宮 崇 (筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学)  
鈴木 豪 (筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学)  
杉原誠人 (筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学)

### 研究要旨

関節リウマチ(RA)の発症において TNF- $\alpha$  が重要な働きを果たしている。本研究では、TNF- $\alpha$  の制御分子のひとつである Tristetraprolin(TTP)に焦点をあて、RA 患者末梢血における TTPmRNA 発現、TTP-SNP アリル解析、in vitro での TTP-SNP 機能解析、TPTTP-ZF トランスジェニックマウスにおけるコラーゲン誘導関節炎(CIA)への影響を検討した。その結果、以下の事実を明らかにしてきた。1)TTPmRNA 発現は TNF- $\alpha$  mRNA 発現と極めて有意な相関を呈している。2)TTP-SNP の G アリルと A アリルの頻度に有意な差はなかったが、遺伝子型 GG が AG/AA に比べて RA の罹患期間が短いこと。3)遺伝子型 GG の方が AA に比べて TTP のプロモーター活性が低いこと。4)TTP および ZF トランスフェクタントでは、TNF- $\alpha$  の mRNA、蛋白発現ともに減少していること。5)TTP-ZF トランスジェニックマウスにおいて、(1)CIA が有意に抑制されたこと、(2)関節組織の炎症細胞浸潤、滑膜細胞増殖が有意に抑制されていたこと、(3)関節局所における TNF- $\alpha$  および IL-6mRNA 発現が減少していたこと、(4)LPS 刺激による TNF- $\alpha$  および IL-6 産生が低下していたこと、(5)TNF- $\alpha$  および IL-6mRNA の安定性が低下していたこと、などを解明した。以上の研究成果より、TTP-ZF 分子は、TNF- $\alpha$  および IL-6mRNA の安定性を損い TNF- $\alpha$ /IL-6 発現を減少させ自己免疫性関節炎および RA の発症抑制に重要であることが示唆された。今後、TTP を分子標的とした RA の新規治療戦略の開発を進める。

### A.研究目的

関節リウマチ(RA)の発症に TNF- $\alpha$  が重要な働きを果たしており、TNF ブロッカーによる治療は RA の根治的な治療として脚光を浴びている。しかし、その TNF ブロッカーが有効である RA 患者は約 50%であり、無効症例においては他のサイトカインブロッカー(IL-6 や IL-1 $\beta$ )、T 細胞をターゲットした治療薬(CTLA4-Ig など)や B 細胞に対する治療薬(抗 CD20 抗体など)に変更することになる。患者の QOL を改善し、医療効率を高めるためには、治療前あるいは治療開始後早期に、治療薬の有効性を知り得るバイ

オマーカーが必要である。その一つの候補分子として TNF- $\alpha$  の制御分子である tristetraprolin(TTP)分子に焦点を当て、末梢血リンパ球における mRNA 発現、SNP 解析、治療前後の発現と有効性との関連、さらに TTP のトランスフェクタントおよび TTP-ZF トランスジェニックマウスを作成して関節炎発症における TTP-ZF 分子の制御機構を明らかにし、TTP-ZE 分子を標的とした新規治療戦略を開発することを目的とした。

### B.研究方法

- 1) 前、治療2週間後、治療 54 週後の末梢血リンパ球を採取して TNF- $\alpha$ 、TTP の mRNA 発現について real-time PCR 法で解析した。コントロールとして 20 名の健常人末梢血リンパ球を用いた。
- 2) 155名のRA患者および100名の健常人由来の genomic DNA について TTP 遺伝子のプロモーター領域に存在する SNP359(-194)について PCR-RFLP 法を用いて解析した
- 3) TTP-SNP359 GGとAAについて発現ベクターに挿入し Luciferase アッセイによりそれぞれのプロモーター活性を比較した
- 4) ヒト TTP 遺伝子および zinc finger 部位(ZF)を発現レトロウイルスベクターに挿入して Jurkat T 細胞に導入し、PHA 刺激による TNF- $\alpha$  mRNA および蛋白発現について検討した。
- 5) マウス TTP 遺伝子および ZF 遺伝子を DBA/1 マウスの受精卵に遺伝子導入しトランスジェニックマウスを作成した。In vitro での LPS 刺激による TNF- $\alpha$  発現、TNF- $\alpha$  mRNA の安定性、in vivo での CIA の発症頻度などについて検討した。

#### (倫理面への配慮)

ヒトの検体を使用する際には、大学の倫理委員会の承認を得た上で、患者さんにインフォームド・コンセントを施行し、十分に研究内容を理解していただき、ご本人の同意を得た上で研究を実行した。マウスの実験においては疼痛を与えないために麻酔科で対処した。

#### C.研究結果

- 1) TTP mRNA 発現は TNF- $\alpha$  mRNA 発現と極めて有意な相関を呈した。しかし、infiximab 治療有効例と無効例とで TTP 発現に相違は認められなかった
- 2) TTP-SNP の G アリルと A アリルの頻度に有意な差はなかったが、遺伝子型 GG が AG/AA に比べて RA の罹患期間が短い事が判明した。
- 3) 遺伝子型 GG の方が AA に比べて TTP のプロモーター

活性が 1/2 と低いことが判明した。

- 4) TTP および ZF トランスフェクタントでは、TNF- $\alpha$  の mRNA、蛋白発現ともに減少していることが判明した。
- 5) TTP- ZF トランスジェニックマウスにおいて、関節炎スコアの有意な低下および発症頻度の抑制が認められた。組織学的解析により関節炎の有意な抑制が認められた。関節において TNF- $\alpha$  mRNA 発現が低下していた。LPS 刺激による TNF- $\alpha$  および IL-6 産生が有意に減少していた。TNF- $\alpha$  および IL-6 mRNA の安定性が低下していることが判明した。

#### D.考察

TNF- $\alpha$  の制御分子である TTP のプロモーター領域の SNP 解析は RA 患者において重篤化する予想因子となりうると考えられた。TTP-ZF 分子は、in vitro および in vivo における解析から、TNF- $\alpha$  および IL-6 mRNA 発現を抑制することにより自己免疫性関節炎を制御していることが判明した。今後、TTP-ZF 分子を標的とした治療戦略の開発を進めていく。

#### E.結論

TTP-ZF 分子は、TNF- $\alpha$  および IL-6 mRNA の安定性を損い TNF- $\alpha$  /IL-6 発現を減少させ自己免疫性関節炎および RA の発症抑制に重要であることが示唆された。

#### F.健康危険情報

特記事項なし

#### G.研究発表

##### 1. 論文発表

1. Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Horikoshi, M., Sugihara, M., Hayashi, T., Chino, Y., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. NK1.1+ gdT cells attenuates IL-18 plus IL-2-induced murine interstitial lung disease. Am. J. Res. Cell. Mol. Biol. (in press)
2. Hikami, K., Kawasaki, A., Koga, M., Ito, S., Hayashi,

- T., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Kusaoi, M., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Arinami, T., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Association of a functional polymorphism in the 3' untranslated region of SPI1 with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* (in press)
3. Kawasaki, A., Ito, S., Furukawa, H., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Ohashi, J., Graham, R.R., Matsuta, K., Behrens, T.W., Tohma, S., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Association of TNFAIP3 interacting protein 1, TNIP1 with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study. *Arthritis Res. Ther.* 2010 Sep 17;12(5):R174. [Epub ahead of print]
  4. Iizuka, M., Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Tsuboi, H., Nakamura, Y., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive immune response induces Sjogren's syndrome-like sialoadenitis. *J. Autoimmunity* 35: 383-389, 2010.
  5. Shen, N., Fu, Q., Deng, Y., Qian, X., Zhao, J., Kaufman, K.M., Tang, Y., Chen, J-Y, Yang, W., Wong, M., Kawasaki, A., Tsuchiya, N., Sumida, T., Kawaguchi, Y., Yum C-Y, Takasaki, Y., Hashimoto, H., Harley, J.B., Guthridge, J.M., Grossman, J.M., Cantor, R.M., Song, Y.W., Bae, S, Cehn, S, Hahn, B.H., Lau, Y.L., and Tsao, B.P. Gender specific association of X-linked TLR7 with male systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:15838-43, 2010.
  6. Tsuboi, H., Matsumoto, I., Wakamatsu, E., Iizuka, M., Nakamura, Y., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. The new epitopes of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 162:53-61, 2010.
  7. Sumida, T., Tsuboi, H., Iizuka, M., Nakamura, Y., and Matsumoto, I. Functional role of M3 muscarinic acetylcholine receptor (m3R) reactive T cells and anti-M3R autoantibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Autoimmunity Reviews* 9:615-617, 2010.
  8. Tashiro, T., Nakagawa, R., Inoue, S., Omori-Miyake, M., Chiba, T., Fujii, S-I, Shimizu, K., Mori, K., Yoshiga, Y., Sumida, T., Watarai, H., and Taniguchi, M. Induction of Th1-biased cytokine production by  $\alpha$ -carba-GalCer, a neoglycolipid ligand for natural killer T cells. *Int. Immunol.* 22:319-28. Epub 2010 Feb 24.
  9. Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Sugihara, M., Hayashi, T., Chino, Y., Matsumoto, I., Ito, S., Ito, S., and Sumida, T. Inhibition of TGF- $\beta$  signaling attenuates IL-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease. *Clin. Exp. Immunol.* 160: 394-402. Epub 2010 Jan 19.
  10. Chen, Q., Lamphier, M., Muramoto, K., Ding, Y., Ynag, H., Mackey, M., Li, W., Liu, D., Inoue, Y., Massaki, N., Patel, T., Groom, A., Reynolds, D., Perron, S., Shirota, H., Matsumoto, I., Sumida, T., Spyvee, M., Schiller, S., ZGusovsky, F., and Marc, K. Prostaglandin E2 stimulation of EP4 promotes Th1 differentiation and Th17 expansion and is critical for autoimmune disease. *Br. J. Pharmacol.* 160: 292-310, 2010.
  11. Iwanami, K., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Inoue, A., Minami, R., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., Nishimura, Y., and Sumida, T. Altered peptide ligands inhibit glucose-6-phosphate isomerase (GPI) peptide-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 11:R167.
  12. Wang, Y., Ito, S., Chino, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Murata, H., Tsutsumi, A., Uchida, K., Usui, J.,

- Yamagata, K., and Sumida, T. Analysis of cytokine balance in lupus nephritis by laser-microdissection. *Clini. Exp. Immunol.* 159:1-10.
13. Inoue, A., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Iwanami, K., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced adipose-related protein in autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum. Ther.* 11:R118
  14. Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Hayashi, T., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. The decrement of soluble CD1d proteins affects the function of NKT cells in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 24:481-486,2009
  15. Tanaka, Y., Matsumoto, I., Iwanami, K., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. B cells have crucial role as autoantibody producers in arthritis mediated by glucose-6-phosphate isomerase. *Clin. Exp. Immunol.* 155:285-294,2009
  16. Ito, I., Kawasaki, A., Ito, S., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Hom, G., Graham, R.R., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Ohashi, J., Behrens, T.W., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Replication of the association between C8orf13-BLK region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Rheum.* 60: 553-558, 2009
  17. Iwanami, K., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Arthrogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase (GPI)-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10:R130. Epub 2008
  18. Kawasaki, A., Ito, I., Hikami, K., Ohashi, J., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., Tsutsumi, A., Koga, M., Arinami, T., Graham, R. R., Hom, G., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Behrens, T.W., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Association of STAT4 polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Res. Ther.* 10:R113, Epub 2008
  19. Matsumoto, I., Zhang, H., Yasukochi, T., Iwanami, K., Tanaka, Y., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Therapeutic effects of antibodies to TNF $\alpha$  and IL-6 and CTLA-4 Ig in mice with glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10: Epub 2008
  20. Yoshiga, Y., Goto, D., Segawa, S., Ohnishi, Y., Matsumoto, I., Ito, S., Tsutsumi, A., Taniguchi, M., and Sumida, T. NKT cells are novel accelerator of IL-17 in the pathogenesis of collagen-induced arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 22: 369-374, 2008
  21. Iwanami, K., Matsumoto, I., Watanabe, Y., Mihara, M., Ohsugi, Y., Mamura, M., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., Kishimoto, T., and Sumida, T. Crucial role of IL-6/IL-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate-isomerase. *Arthritis Rheum.* 58:754-763,2008
  22. Matsui, H., Tsutsumi, A., Sugihara, M., Suzuki, T., Iwanami, K., Kohno, M., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. Expression of Visfatin (pre-B cell colony-enhancing factor) gene in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 67:571-572, 2008
  23. Nakamura, Y., Wakamatsu, E., Tomiita, M., Kohno, Y., Yokoka, J., Goto, D., Ito, S., Matsumoto I., Tsutsumi, A., and Sumida, T. High prevalence of autoantibodies to muscarinic 3 acetylcholine receptor in patients with juvenile Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 67:136-137,2008
  24. Suzuki, T., Tsutsumi, A., Suzuki, E., Sugihara, M., Muraki, Y., Hayashi, T., Chino, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. Tristetraprolin (TTP) gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals.

*Mod. Rheumatol.* 18: 472-479, 2008

25. Matsui, H., Tsutsumi, A., Sugihara, M., Suzuki, T., Iwanami, K., Kohno, M., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. Expression of Visfatin (pre-B cell colony-enhancing factor) gene in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 67:571-572, 2008.

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

図1 RA患者末梢血におけるTNF- $\alpha$ mRNAとTTPmRNA発現の相関

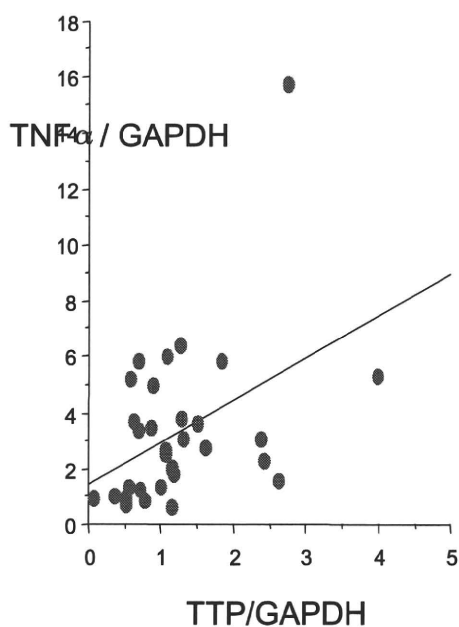


図2 インフリキシマブ使用RA患者と非使用患者におけるTTP-SNP359のアリル頻度

インフリキシマブ使用者においてSNP359のGG allele患者が有意に増加

	インフリキシマブ 使用あり	インフリキシマブ 使用なし	合計
AA/AG (人)	20	126	146
GG (人)	4	5	9
合計 (人)	24	131	155

P = 0.0331 (Fisher's exact test)

図3 TTP-SNP359 アリルGとアリルAにおけるルシフェラーゼ活性の比較

Allele G導入細胞においてルシフェラーゼ活性が有意に低下

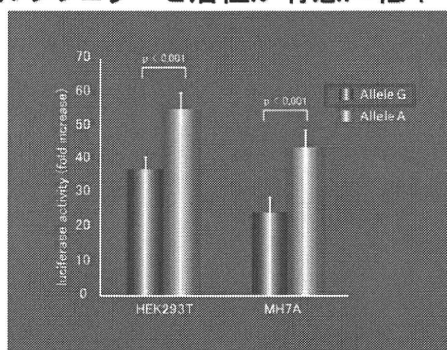


図4 TTPトランスフェクタントおよびZFトランスフェクタントによるTNF- $\alpha$ mRNA発現への影響

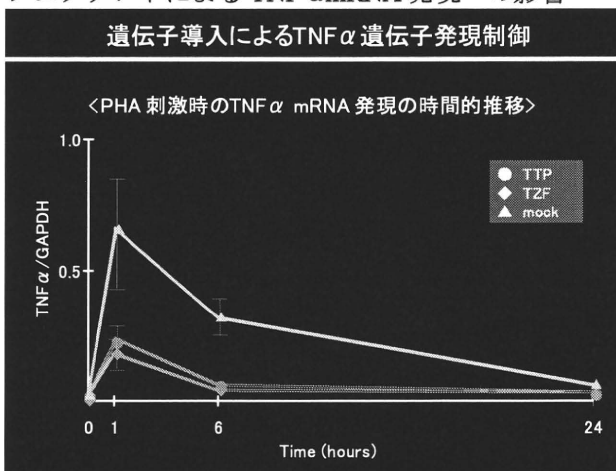


図5 TTP トランスジェニックマウスと TTP-ZF トランスジェニックマウスにおける CII 誘導関節炎の発症頻度

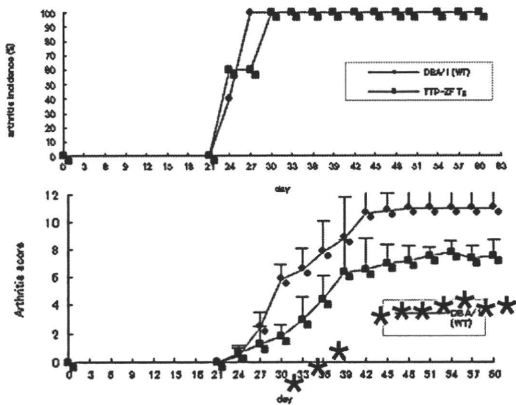


図6 TTP-ZF トランスジェニックマウスの関節組織像 (H-E 染色)

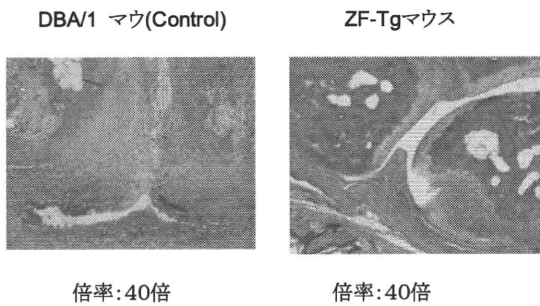


図8 TTP-ZF トランスジェニックマウスにおける CII 反応性 T 細胞からのサイトカイン産生

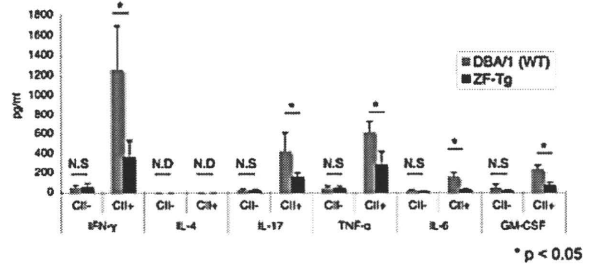


図9 TTP-ZF トランスジェニックマウスにおける TNF- $\alpha$  と IL-6 mRNA の安定性

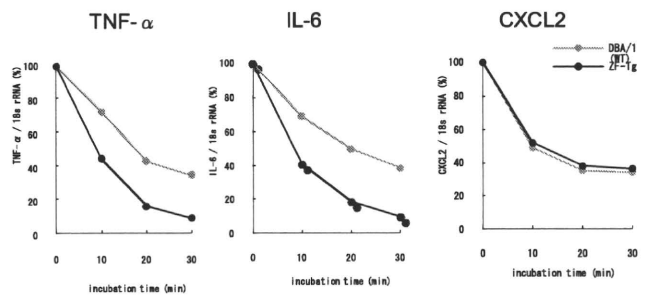


図7 TTP-ZF トランスジェニックマウス関節における TNF- $\alpha$  および IL-6 mRNA 発現

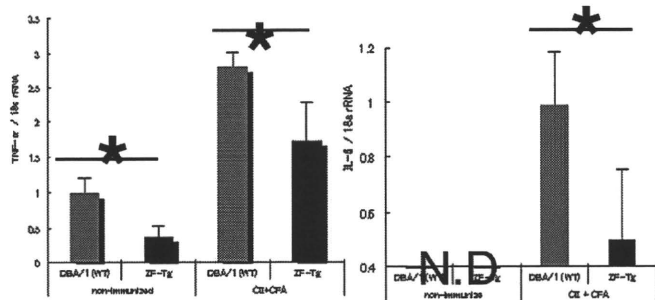
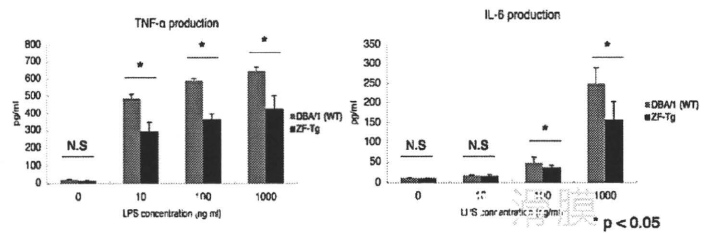


図10 TTP-ZF トランスジェニックマウスにおける LPS 刺激による TNF- $\alpha$  および IL-6 産生





## インフリキシマブによる関節リウマチ患者の関節破壊抑制効果に関する研究

研究分担者 竹内 勤 (慶應義塾大学医学部リウマチ内科 教授)  
研究協力者 田中良哉 (産業医科大学医学部第一内科学講座 教授)  
山中 寿 (東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 教授)

### 研究要旨

インフリキシマブによる、関節リウマチ患者の関節破壊抑制効果を、臨床的有効性、血清インフリキシマブトラフ濃度、骨ビランと関節裂隙狭小化などの観点から、検討を加えた。その結果、体重あたり3mg/kg、8週間隔の最小用量によっても、RECONFIRM-2J など以前からの成績が示す様に、臨床効果以上に強力な関節破壊抑制効果が明らかとなった。一方、関節破壊進行度の速い早期 RA においては、54週後の血清インフリキシマブトラフ濃度が検出限界以下の症例において、20%に関節破壊進行が認められた。これら症例に対しては、インフリキシマブ増量あるいは期間短縮によって血清トラフ濃度を増加させることによって関節破壊の進行を阻止できるかどうか検証する必要がある。軟骨障害を反映すると考えられる関節裂隙狭小化は、骨破壊を反映する骨びらんよりも、スコア点数あたりより機能障害に関わる可能性が明らかとなった。

### A. 研究目的

TNF 阻害薬インフリキシマブは、臨床効果ならびに優れた関節破壊抑制効果を示し、関節リウマチ治療に飛躍的成果をもたらした。しかし、臨床的高価と関節破壊抑制効果は、全例で認められる訳ではなく、その要因解析が個別化治療を展開する上で必須である。そこで、インフリキシマブ関節破壊抑制効果と関連する要因を明らかにすることを目的として以下の解析をおこなった。

### B. 研究方法

RECONFIRM-2J 研究 産業医科大学、東京女子医科大学、埼玉医科大学総合医療センターでインフリキシマブが開始され、54週までの経過観察が行なわれた410症例の中で、0週と54週の手足 X-P が撮影された67例を対象にして行なわれた RECONFIRM-2J 研究登録症例のデータ

セットを用い、種々の臨床要因と関節破壊抑制効果の関連について単変量、多変量解析する。

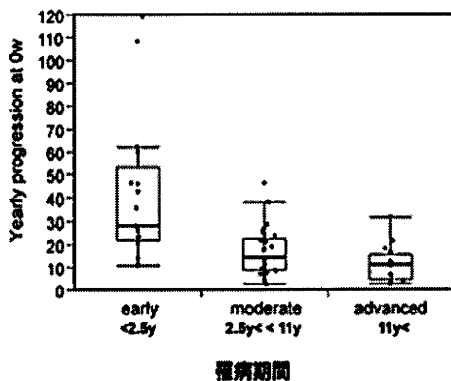
RISING 研究 334 例がオープンでインフリキシマブ 3mg/kg を 0, 2w, 6w に投与され、14 週以降ブラインドで、3mg/kg 群(n=99 例)、6mg/kg 群(104 例)、10mg/kg 群(104 例)の3群で 54 週まで投与が行われた。各来院日の臨床評価とともに、インフリキシマブ血清濃度を測定した。0週と54週の手足 X-P が撮影された症例の関節破壊がシャープ変法によって解析された。

### C. 研究結果

RECONFIRM-2J 研究 1)インフリキシマブ投与前の関節破壊進行度:インフリキシマブ投与前の関節破壊は、vdH-Sharp スコアが 104 で、vdH-Sharp スコアを罹病年数で除した vdH-Sharp スコア年間進行度は 21.3 と、

ATTRACTの7.9に比して高かった。症例を25%4分位点である2.5年以内の早期例(n=17)と、2.5年を超え75%4分位点の11年目までの進行例(n=34)、そして11年を超える晩期例(n=16)に分けて検討した。これまでに指摘されている通り、早期例では平均±標準偏差41.1±31.1(中央値28)と高く、進行期16.2±9.8(中央値14)、晩期11.1±7.8(中央値11)と低値であった(図1)。各罹病期別のvdH-Sharpスコア年間進行度と各種臨床パラメーターとの相関関係を検討したところ、インフリキシマブ投与直前のMTX量、疾患活動性と関連するという興味深い結果を得た。早期例では、有意差こそ認めなかったものの投与前vdH-Sharpスコア(TSS)とMTX用量は $r=0.38$ と正の相関を示し、この間にMTX用量を上げても結果として関節破壊が進行しインフリキシマブの投与になったと考えることが出来る。これに対し、進行期、晩期症例では、TSSとMTX用量は負の相関を示した。MTX増量によってスコア年間進行度は低下することを反映した成績と考えられた。同様の成績は、投与前TSSと疾患活動性指標であるDAS28CRPの間にも認められ、早期では投与前TSSとDAS28には負の相関があり、DASが低値であっても、TSSが進行しているものと考えられた。進行期、晩期では、早期例とは逆に、TSSとDAS28には正の相関が認められた事から、MTX増量による疾患活動性コントロールが重要であることが示された。

図1 インフリキシマブ投与前の年間シャープスコア進行度



RISING 研究 1)インフリキシマブ投与前の関節破壊進行度:インフリキシマブ投与前の年間関節破壊進行度の中央値は、3mg/kg群5.5、6mg/kg群7.6、10mg/kg群6.5で、投与54週後は、それぞれ0.0、0.5、0.0といずれの群でも進行はほぼ抑えられていた。これを関節破壊進行、不変、改善の割合で示すと、3mg/kgは7.0%/88.4%/4.7%、6mg/kg群は13.0%/81.5%/5.4%、10mg/kg群では5.3%/87.4%/7.4%で、6mg/kg群の進行例の割合が多少高値で有った以外は、ほぼ、同様の割合を示した。6mg/kgで進行例が多い事に関しては、投与前の年間進行度が7.6と3群の中で最も高い事が関連していると考えられた。

2)関節破壊進行度の累積図:年間進行度の累積プロット図解析で3群間を比較すると、修復を示す $-10 \sim -20$ から、進行を示す $10 \sim 20$ までに3群間ともほぼ同様のプロットを示していた。

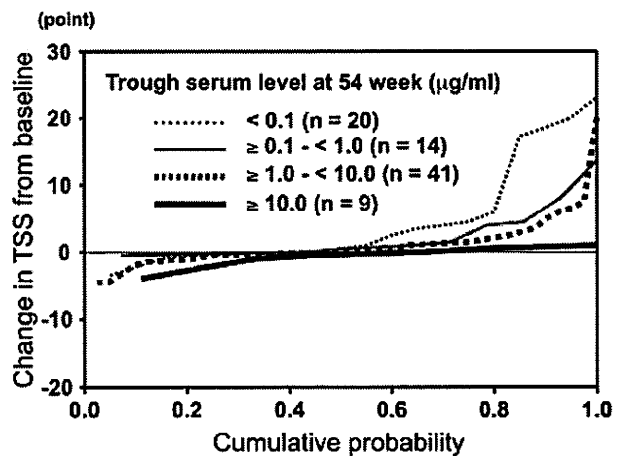


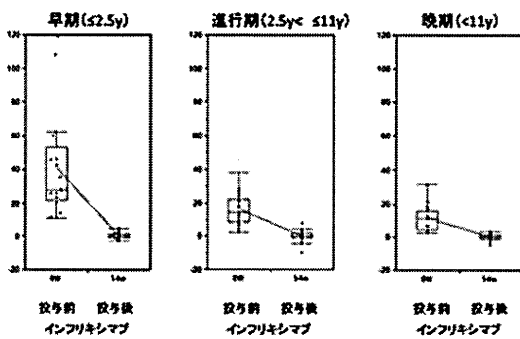
図2 RISING 研究 罹病期間3年未満の早期RA(n=84)における関節破壊進行度

3)インフリキシマブ投与54週後の血清濃度別の関節破壊進行度:各用量群の54週の血清インフリキシマブ濃度は、3mg/kg群で0.4ug/ml、6mg/kg2.3ug/ml、10mg/kg5.5ug/mlで、臨床的有効性と血清濃度に良い相関が見られることから、関節破壊進行度と54週インフリキシマブ血清濃度との関連が解析された。その結果、54週の血清インフリキシマブが検出限界以下の群では、10%ほど

の症例が 5-20 の進行を示すのに対し、10ug/ml とインフリキシマブ濃度が高値の症例では、これが 0-5 とほぼゼロ進行にとどまった。興味深いのは、罹病期間3年未満の早期 RA84 例のみを対象として、54週血清インフリキシマブ濃度別の累積プロット解析を行うと、この差がより顕著になった(図2)。特に、インフリキシマブが検出限界以下の症例では、年間関節進行度5を超える進行例が20%に認められた。一方、インフリキシマブ濃度が上昇すると共に進行例は減少し、10ug/ml 以上の高値例では関節破壊進行を認めなかった。

インフリキシマブによる骨びらん抑制と関節裂隙狭小化抑制  
 1) 総スコア、骨びらんスコア、関節裂隙狭小化に及ぼす影響:インフリキシマブ投与前後の総スコア、骨びらんスコア、関節裂隙狭小化スコアは、総スコアが 8.8+/-9.1 から 0.5+/-3.9 へ有意に減少(p<0.0001)、骨破壊を反映する骨びらんも 4.7+/-4.8から-0.1+/-へと低下した(P<0,0001)。一方、軟骨破壊を関連する裂隙狭小化も他と同様に、4.0+/-5.6 から-0.2+/-2.0 へと同様に有意に低下を見せた。

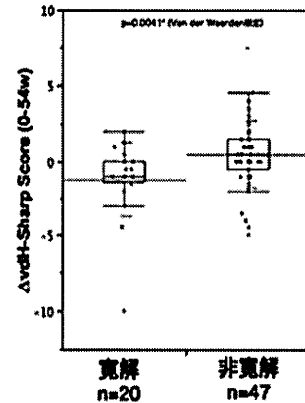
図3 インフリキシマブ投与による関節破壊の抑制効果



2) 臨床的寛解例の関節破壊障害度と投与1年目の HAQ の関係: 54週目に臨床的寛解に至った症例のみを抽出し、van der heijde-sharp 変法による各スコアと54週の機能的寛解(HAQ0.5 以下)との関係をロジスティック回帰分析した。その結果、骨びらんとは  $r=0.1175(p=0.2049)$  と有意差を認めなかったが、関節裂隙狭小化では、

$r=0.2840(p=0.0018^*)$  と有意差をもって関連する事が明らかとなった。しかもロジスティック回帰直線の傾きは、骨びらんに比べ関節裂隙がより急峻で、HAQ に及ぼす影響はより高いと考えられた。

図4 臨床的寛解・非寛解例の関節破壊抑制効果



#### D. 考察

関節破壊の年間進行度が早い日本人 RA において、インフリキシマブ各用量群の強力な関節破壊阻止効果が確認された。54週の血清インフリキシマブ濃度別の累積プロット解析から、インフリキシマブの血清濃度が検出されない早期 RA 症例では、20%もが進行する事が明らかとなった。これら症例に対してはインフリキシマブの増量、あるいは期間短縮を行って関節破壊進行を抑える工夫が必要である。今後、この戦略によって、真に関節破壊抑制の進展を完全に良くし出来るかどうか、検証する必要がある。軟骨障害を反映すると考えられる関節裂隙狭小化は、骨破壊を反映する骨びらんよりも、スコア一点あたりより機能障害に関わる可能性が明らかとなった。しかも、関節裂隙狭小化スコアの関与は、ほぼ直線的であるのに対し、骨びらんスコアは、ある閾値を境に急速に機能障害に影響を及ぼす可能性が指摘された。これらを総合的に考慮した RA 関節破壊抑制の治療戦略が求められる。

## E. 結論

インフリキシマブによる関節リウマチ患者の関節破壊抑制効果を検討し、3mg/kg、8週間隔の最小用量によっても、RECONFIRM-2J など以前からの成績が示す様に、臨床効果以上に強力な関節破壊抑制効果が明らかとなった。一方、関節破壊進行度の速い早期 RA においては、54週後の血清インフリキシマブトラフ濃度が検出限界以下の症例において、20%に関節破壊進行が認められた。また、軟骨障害を反映すると考えられる関節裂隙狭小化は、骨破壊を反映する骨びらんよりも、スコア一点数あたりより機能障害に関わる可能性が明らかとなった。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takeuchi T, Tatsuki Y, Nogami Y, Ishiguro N, Tanaka Y, Yamanaka H, Harigai Y, Ryu J, Inoue K, Kondo H, Inokuma S, Kamatani N, Ochi T, and Koike T. Post-marketing Surveillance of the Safety Profile of Infliximab in 5,000 Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis* 67:189-94, 2008.
2. Sekiguchi N, Kawauchi S, Furuya T, Matsuda K, Ando S, Ogasawara M, Inaba N, Abe T, Ito S, and Takeuchi T. Monitoring of cDNA microarray profile in peripheral blood during infliximab treatment of Rheumatoid Arthritis patients. *Rheumatology* 47:780-88, 2008.
3. Tanaka Y, Takeuchi T, Inoue E, Saito K, Sekiguchi N, Iikuni N, Nawata M, Kameda H, Shinozaki M, Iwata S, and Amano K, and Yamanaka H. Retrospective clinical study on the notable efficacy and related factors of infliximab therapy in a rheumatoid arthritis management group in Japan: One-year clinical and radiographic outcomes (RECONFIRM-II). *Mod Rheum* 18:146-52, 2008.
4. Tokuda H, Sakai F, Yamada H, Johkoh T, Imamura A, Dohi M, Hirakata M, Yamada T, Kamatani N, Kikuchi Y, Sugii S, Takeuchi T, Tateda K, and Goto H. Clinical radiological features of pneumocystis pneumonia in patients with Rheumatoid Arthritis, in comparison with Methotrexate pneumonitis and Pneumocystis pneumonia in acquired immunodeficiency syndrome: A multicenter study. *Intern Med* 47:915-23, 2008.
5. Takeuchi T, Yamanaka H, Inoue E, Nagasawa Y, Nawata M, Ikari K, Saito K, Sekiguchi N, Saito E, Kameda H, Iwata S, Mochizuki T, Amano K, and Tanaka Y. Retrospective clinical study on the notable efficacy and related factors of infliximab therapy in a rheumatoid arthritis management group in Japan: One-year outcome of joint destruction (RECONFIRM-2J). *Mod Rheum* 18:447-454, 2008.
6. Inokuma S, Sato T, Sagawa A, Matsuda T, Takemura T, Ohtsuka T, Saeki Y, Takeuchi T, and Sawada T. Proposals for leflunomide use to avoid lung injury in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheum* 18:442-446, 2008.
7. Komano Y, Harigai M, Koike R, Sugiyama H, Ogawa J, Saito K, Sekiguchi N, Inoo M, Onishi I, Ohashi H, Amamoto F, Miyata M, Kageyama G, Imaizumi K, Tokuda H, Okochi Y, Tanaka Y, Takeuchi T, and Miyasaka N. Pneumocystis pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab: a retrospective review and case-control study of 21 patients. *Arthritis & Rheum* 61:305-12, 2009.
8. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, and Azuma J. Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-interleukin(IL)-6 receptor monoclonal antibody, in monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM